

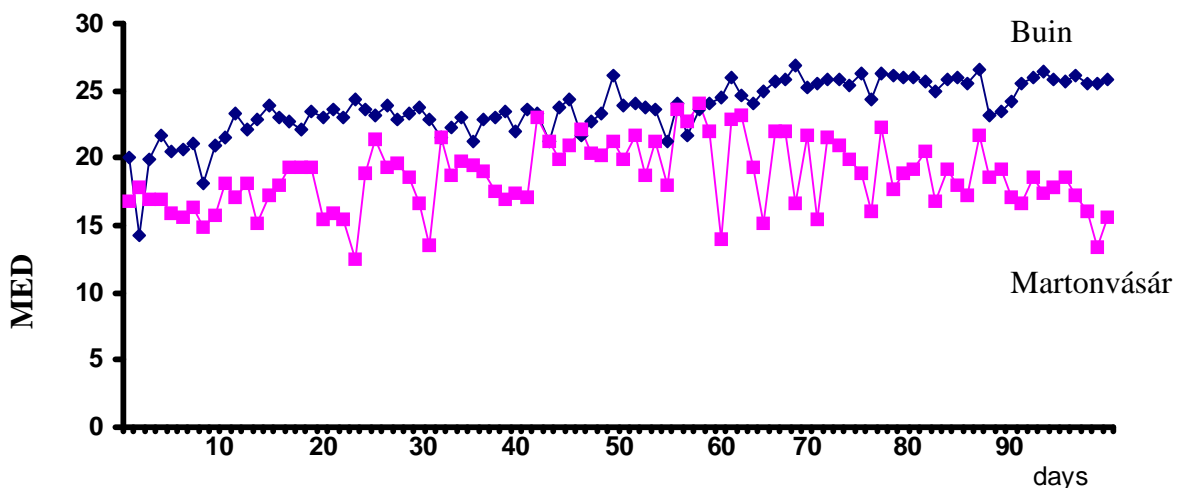
Szabadföldi kísérletek

Ötéves szántóföldi vizsgálataink során arra kívántunk elsősorban választ kapni, hogy a magyarországi viszonyoktól eltérő, magasabb UV-B sugárzási szint hatására - több kukorica genotípus átlagában - a védekező mechanizmusban fontos szerepet játszó antociánok képződésében milyen mennyiségi változások történnek.

Ugyanazon tíz martonvásári beltenyésztett kukoricavonalat (5 korai: L2-E, L3-E, L4-E, L9-E, L10-E, valamint 5 közép- és késői tenyészidejű: L1-L, L5-L, L6-L, L7-L, L8-L) négyismétléses kísérletbe állítottuk be Martonvásáron (Magyarország) és Buin-ban (Chile) lévő tenyészkertünkben 2000-2004. években. Az év egymásnak megfelelő hónapjainak (Martonvásár: május, június, július; Buin: november, december, január) utolsó dekádjában (a tenyészanyagok virágzását követően) történt a mintavételezés. Ismétléseként 10 növényt mintáztunk, a címer alatti 3-4. levélből. A chile-i minták hazaszállítása szárazjégben, 24 órán belül megtörtént, majd feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Az antociántartalom meghatározása spektrofotometriásan történt UV-VIS spektrofotométerben (Shimadzu 160A, Japán). Az ábrákon az 1 g friss tömegre vonatkozó abszorbancia különbségeket ($A_{530}-A_{479}$ / g friss tömeg) adtuk meg. Az UV-B sugárzási adatokat Chile és Magyarország Meteorológiai Szolgálatára bocsátotta rendelkezésünkre. A statisztikai értékelésekhez (két- és háromtenyezőes varianciaanalízis) az AGROBASE'99 ANOVA programját használtuk.

A két kísérleti helyen Martonvásáron (Magyarország) és Buin-ban (Chile), az 5 kísérleti év 3 azonos hónapjára számított biológiailag effektív UV-B sugárzás szignifikánsan eltért egymástól. Ez a különbség Chilében közel +30 %-ot jelentett. A legnagyobb különbség 2001-ben volt, amikor is a Chilében mért adatok 37 %-kal voltak nagyobbak, mint Magyarországon. Az adatok elemzése során azt is megállapítottuk, hogy a szórás értéke Magyarországon volt nagyobb. Nálunk a napi adatok között lényeges ingadozás volt megfigyelhető, ugyanakkor Chilében - ezekre a hónapokra jellemző teljesen felhőtlen égbolt miatt - ez nem volt tapasztalható (1. *ábra*).



1. ábra. A biológiailag effektív UV-B sugárzás napi összegeinek átlagos menete 5 év (2000-2004) alapján, az év egymásnak megfelelő időszakában Buinban (Chile) [november, december, január] és Martonvásáron [május, június, július] 1 MED=21 mJ/m², MED= Minimális Erythema Dózis

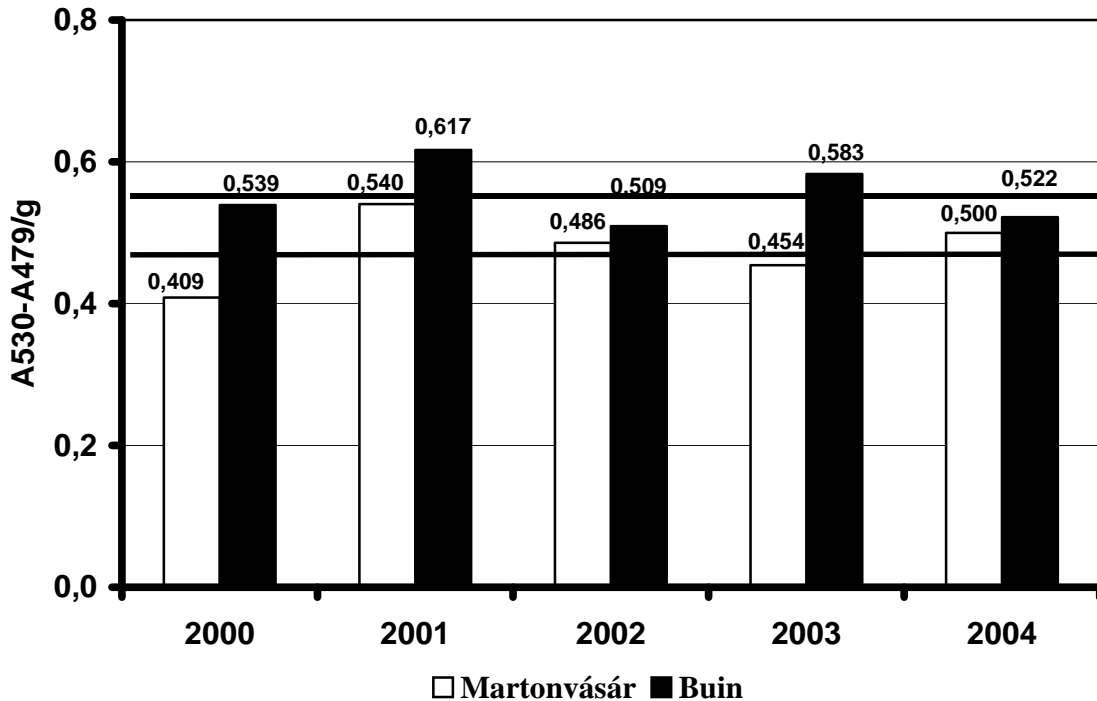
Mind az 5 évben ugyanazzal a 10 beltenyésztett (5 korai: L2-E, L3-E, L4-E, L9-E, L10-E és 5 közép-, illetve késői tenyészidejű: L1-L, L5-L, L6-L, L7-L, L8-L) kukoricavonallal dolgoztunk. A két- és háromtényezős variancia analízisek eredményei alapján a következőket állapíthatjuk meg. A Chiléből hozott minták összes antocián tartalma – a 10 vonal és az 5 év átlagában – szignifikánsan (16%-kal) nagyobb volt, mint a Magyarországon vett minták (Buin: $A_{530-479} = 0,555$, Martonvásár: $A_{530-479} = 0,478$) abszorbancia átlagértékei (**1. táblázat**).

1. Táblázat Az antociántartalomban jelentkező különbségek beltenyésztett kukoricavonalak leveleiben 2 eltérő kísérleti helyen 5 év átlagában. $LSD_{5\%}=0,023$ (vonalak között), $LSD_{5\%}=0,010$ (kísérleti helyek között), $LSD_{5\%}=0,016$ (évek között). A táblázatban szereplő számok az abszorbancia különbségeket ($A_{530}-A_{479}$ nm/g friss tömeg) mutatják.

		MARTONVÁSÁR (HUNGARY)						BUIN (CHILE)					
		YEARS					MEAN OF LINES	YEARS					MEAN OF LINES
No.	LINES	2000	2001	2002	2003	2004	MEAN OF LINES	2000	2001	2002	2003	2004	MEAN OF LINES
1	L1-L	0,566	0,800	0,680	0,659	0,684	0,678	0,776	0,616	0,675	0,679	0,622	0,674
2	L2-E	0,257	0,229	0,238	0,312	0,293	0,266	0,358	0,463	0,350	0,578	0,536	0,457
3	L3-E	0,371	0,357	0,434	0,301	0,681	0,429	0,381	0,523	0,512	0,660	0,608	0,537
4	L4-E	0,308	0,387	0,209	0,430	0,311	0,329	0,568	0,580	0,542	0,420	0,291	0,480
5	L5-L	0,692	0,863	0,731	0,672	0,730	0,737	0,564	0,809	0,474	0,640	0,587	0,615
6	L6-L	0,223	0,674	0,501	0,460	0,704	0,513	0,428	0,734	0,370	0,566	0,429	0,506
7	L7-L	0,390	0,590	0,685	0,479	0,333	0,495	0,621	0,447	0,528	0,569	0,464	0,526
8	L8-L	0,472	0,860	0,604	0,344	0,474	0,551	0,595	0,754	0,520	0,682	0,657	0,641
9	L9-E	0,473	0,206	0,390	0,454	0,423	0,407	0,660	0,562	0,483	0,566	0,639	0,582
10	L10-E	0,333	0,436	0,385	0,338	0,366	0,372	0,440	0,681	0,639	0,476	0,384	0,524
	MEAN OF YEARS	0,409	0,540	0,486	0,454	0,500	0,478	0,539	0,617	0,509	0,583	0,522	0,554

A háromtényezős varianciaanalízis eredménytáblázatainak MQ értékei alapján megállapítható, hogy a levelek antociántartalmára legnagyobb hatása a helynek volt, ezt követte a fajta hatása, míg a tényezők közül a vizsgált tulajdonságra a legkisebb befolyást az évjárat gyakorolta. A kölcsönhatások közül legnagyobb volt a fajta x hely, fajta x év, majd ezt követte az év x hely interakció. A vizsgált tulajdonságnál a tényezők fő hatása és a kölcsönhatások $P = 0,1\%$ -os szinten szignifikánsak voltak.

A 2. ábrán az egyes években kapott összantocián értékeket tüntettük fel a két kísérleti helyen. Mind az öt kísérleti évben a chilei minták átlagértékei voltak nagyobbak.



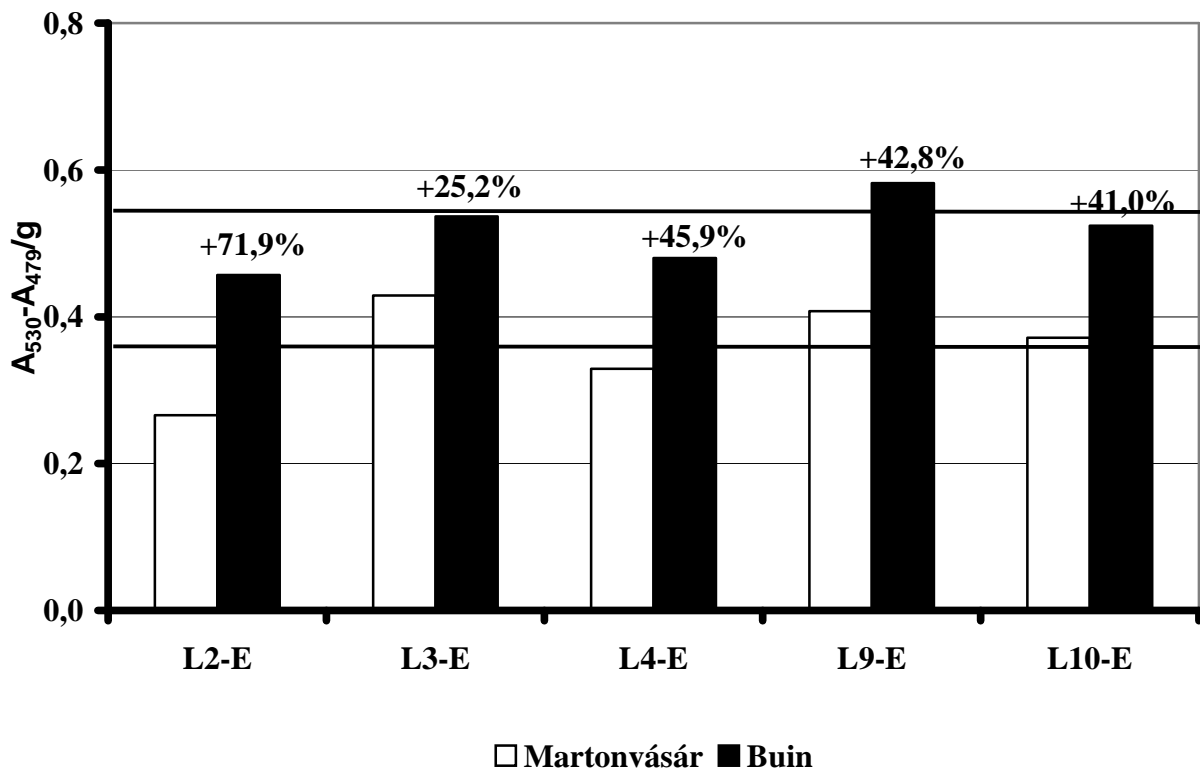
2. ábra. Tíz beltenyésztett kukoricavonal leveleiben mért abszorbancia értékek 5 év átlagában a 2 kísérleti helyen (Martonvásár, Buin).

Ez az ötéves kísérletsorozat egyértelműen azt bizonyítja, hogy a kukoricára is feltehetően negatívan ható biológiailag effektív és igazolhatóan nagyobb UV-B sugárzás a különböző genotípusok átlagában - anyagcsere szinten - válaszreakciót eredményezett. Nagyobb UV-B sugárzás hatására az antocián szintézis a legtöbb genotípusnál aktiválódik. Míg a késői beltenyésztett vonalaknál az amúgy is magasabb összantocián értékek gyakorlatilag változatlanok a megnövekedett UV-B sugárzás hatására, addig az 5 korai (F 2, CM 7, stb. rokonsági körbe tartozó) anyagnál (L2-E, L3-E, L4-E, L9-E, L10-E) igen jelentős, összantocián növekedés volt megfigyelhető öt év átlagában. Ezeknél az anyagoknál az évenkénti chilei értékek is kivétel nélkül mind szignifikánsan magasabbak voltak. A kinti tenyészkerti munkáknál legtöbbször ezeknél a genotípusoknál találtunk virágzásbeli aszinkronizációt és meddőséget. (Volt olyan év, hogy egyes vonalak fajtafenntartása a nővirágzat megjelenésének hiányában egyáltalán nem sikerült.)

Az 1. táblázat adatainak részletes elemzése alapján megállapítható, hogy a késői tenyészidejű vonalaknál az öt év átlagában mindkét helyen közel azonos és magas értékek voltak. Ezek közül az egyik legkésőbbi tenyészidejű, L1-L jelzésű beltenyésztett vonal szintetizálta a legtöbb antociánokat.

A korai érésűek között találtunk olyan beltenyésztett vonalat, melyek ugyanazon a helyen minden évben szinte azonos reakciót mutattak (pl. L2-E, L4-E). Más korai vonalaknál

(L9-E, L10-E) pedig a kapott értékek közötti szórás jóval nagyobb volt. Mindez feltehetően azt igazolja, hogy az eltérő genotípusú kukorica vonalak között magasabb UV-B sugárzásra adott válaszreakciók tekintetében lényeges különbségek vannak. Az évek és termőhelyek átlagában (3. ábra) ezen korai anyagoknál a spektrofotometriásan mérhető növekmény chilei átlagértéke több mint 45%-kal volt magasabb, mint a Magyarországon mért érték. Az L2-E jelzésű vonalnál a kinti össz-antociántartalom növekedésének mértéke meghaladta a 71%-ot, de az L4-E, L9-E és az L10-E vonalaknál is ez az érték 40% feletti volt.

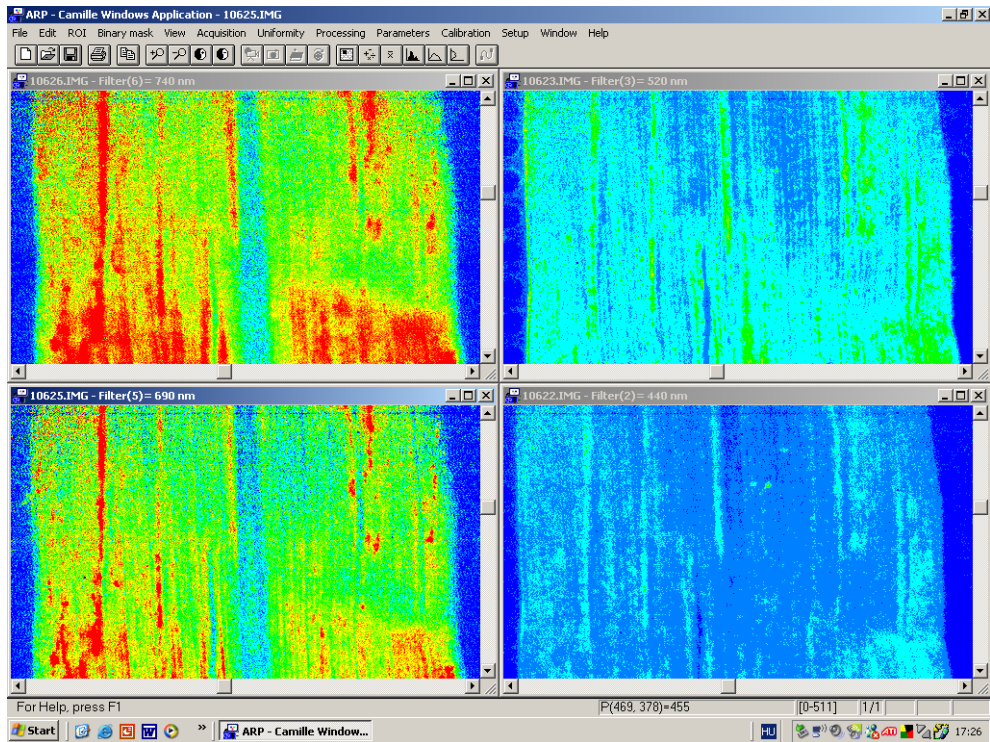
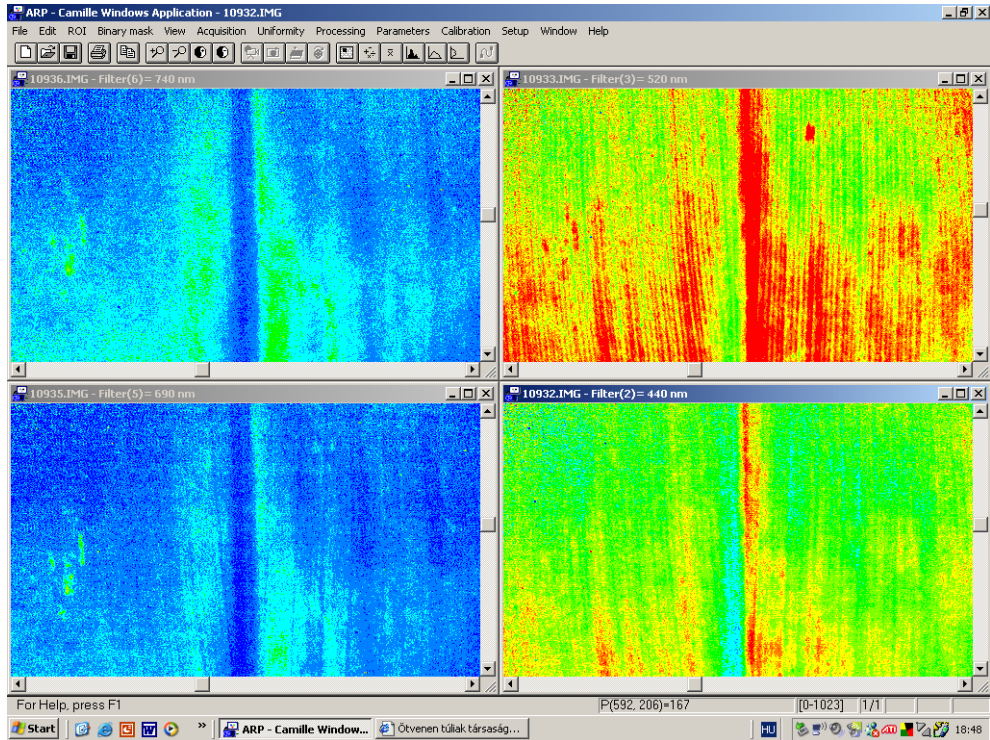


3. ábra. Öt korán érő beltenyészített kukoricavonal abszorbancia értékei 3 év átlagában (2000-2004) 2 kísérleti helyen.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy vannak olyan genotípusok (vizsgálatainkban a késői tenyészidejűek), melyek antociántartalma eleve magasabb, így az erősebb UV-B sugárzással szembeni védekezési mechanizmusuk adott, s feltehetően ezért maradtak el a látványos válaszreakciók. Kísérleteinkben amúgy ezek a vonalak bizonyultak stressztűrőbbeknek.

Ezt erősítették meg a fiziológiai állapot jellemzésére szolgáló többhullámhosszú fluoreszcencia leképezés módszerével kapott eredmények is. Az 5 késői vonalnál az F440/F690 arányok magas értékei azt jelzik, hogy a kék spektrális tartományban fluoreszkáló anyagok (köztük valószínűleg a védelmi rendszerben jelentős szerepet játszó antociánok) mennyisége ezeknél a legtöbb. Ezek a változások, a stressz akklimációként értékelhetők. Ugyanakkor vannak olyan – főleg korai tenyészidejű – genotípusok, melyek leveleiben jóval alacsonyabb az antociántartalom, de egy nagyobb UV-B sugárzás következtében annak mennyisége ugrásszerűen megnő. Ami viszont nem jelenti biztosan azt, hogy ez által a vonalak stressztűrőbbekké is válnának, mint ahogy erre – a chilei tapasztalataink alapján – a korábbiakban már utaltunk. A stresszeltségi szintet mutató F440/F690 arányok értékei ezeknél lényegesen alacsonyabbak voltak, jelezvén a vonalak kisebb mértékű akklimációs képességét.

A több hullámhosszú leképezési technika képi megjelenítését egy késői (L1) és egy korai (L2) beltenyészített kukoricavonal leveleiben az UV-B sugárzás hatására (Martonvásár, 2006; UV-B sugárzási dózis: 21 MED) bekövetkezett változással mutatjuk be (**4. ábra**). Négy hullámhossznál – a kék (F440), a zöld (F520), a vörös (F690) és a távoli vörös (F740) spektrális tartományban – végeztük a fluoreszcencia leképezést. A különböző stresszfaktorok (jelen esetben az UV-B sugárzás) által okozott funkciócsökkenés, megváltozott állapot így képszerűen is megjeleníthető, ami lehetővé teszi a kukoricalevél különböző részein bekövetkező, eltérő változások regisztrálását a stressz kezdeti szakaszán már akkor is, amikor a károsodások még szabad szemmel nem láthatóak. A leképezési módszerrel kapott képek megbízható kiértékeléséhez a fotoszintézissel összefüggő, de más módszerekkel kapott értékekre (nettó fotoszintézis, sztóma konduktancia, klorofill a és b, valamint antociánok mennyisége stb.) is szükség van.



4. ábra. Fluoreszcencia leképzési technika alkalmazása UV-B indukált élettani/biokémiai változások képi megjelenítésében L1 késői (felső ábra) és L2 korai (alsó ábra) érésű beltenyészett kukoricavonalak leveleiben. Mintavétel időpontja: 2006. július 25, az UV-B sugárzás mértéke: 21 MED

Kísérletek UV-B kamrában

Ebben a kísérletsorozatban 2 késői (A=HMV 5405, és B=MHV 847, mindkettő az Iodent rokonsági körbe tartozik), 2 korai (C=89-79 és D=LDR-08, mindkettő a CM 7 származású) érésű beltenyészett kukoricavonalat vizsgáltunk. Először az UV-B sugárzásnak a nettó fotoszintézisre ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) gyakorolt hatását tanulmányoztuk (22 °C, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PPFD mellett). A széndioxid asszimilációt infravörös gázanalizátorral, míg a klorofill-a fluoreszcencia indukciót PAM 2000 típusú műszerrel mértük.

Megállapítottuk, hogy az UV-B sugárzás a késői genotípusok nettó fotoszintézisére nem gyakorolt hatást. Ugyanakkor a korai genotípusokban ez a fotoszintetikus aktivitás szignifikánsan ($p < 0,05$ szinten) csökkent (2. táblázat).

2. táblázat Nettó fotoszintézis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) változása UV-B sugárzás hatására beltenyészett kukorica vonalak leveleiben. A mérések 22° C 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PPFD történtek. Az eredmények 5 mérés átlagát tükrözik. *: szignifikáns $p < 0,05$ szinten.

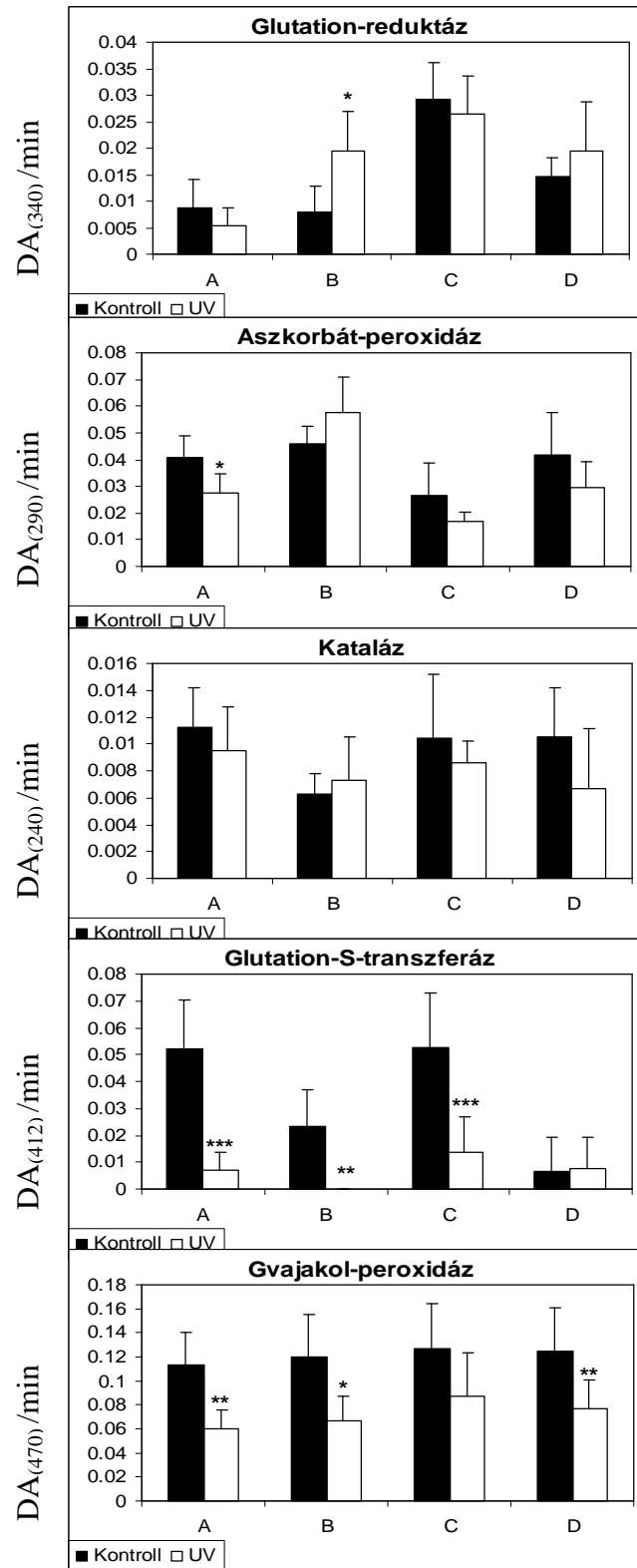
Genotípus:	Kontroll	UV-B
A (HMV 5405)	10,9±3,1	14,2±4,0
B (HMV 847)	9,4±1,4	9,4±1,3
C (89-79)	8,5±1,1	6,0±2,0*
D (LDR-08)	14,7±4,3	9,9±0,9*

A késői törzsek fotoszintézisére nem volt szignifikáns hatással az erős UV-B sugárzás, toleránsabbak voltak. Ezt a tendenciát erősítették az antociántartalommal összefüggő mérések is. Ezek a törzsek eleve magasabb antociántartalommal rendelkeztek, és ezért tolerálták jobban az UV-B sugárzást. A korai törzsekben a sugárzás hatására szignifikánsan csökkent a nettó fotoszintézis mértéke. Ezen a törzseket Kanadában, viszonylag hidegebb körülmények között nemesítették, ezért sokkal érzékenyebbek az UV-B sugárzásra. Öt éves adatok alapján elmondható, hogy ezeknél a korai genotípusokban - Chilében a magasabb UV-B sugárzási szinten - drasztikus növekedés volt tapasztalható az antociántartalomban. Ez is azt bizonyítja, hogy e törzsek genetikai eredete szoros kapcsolatban van a kétféle aspektusból (antociántartalom, nettó fotoszintézis) végzett élettani paraméterekkel. Ugyanakkor megállapítottuk azt is, hogy az UV-B nem volt hatással sem a sztómakonduktivitásra, sem a PSII kvantumhatásfokára (nem közölt adatok).

Az abiotikus stresszorok - a mi esetünkben az UV-B - a növényi sejt különböző részeiben reaktív oxigénformák szintézisét eredményezik. Ezek semlegesítése az antioxidáns rendszer enzimatis és nem enzimatis komponenseinek a feladata. A kamra kísérletek során az UV-B és az egyes antioxidáns enzimek aktivitása közötti kölcsönhatást tanulmányoztuk. Összesen 5 enzimet (glutathion-reduktáz, aszkorbát-peroxidáz, kataláz, glutathion-S-transzferáz és gvajakol-peroxidáz) vizsgáltunk.

Az antioxidáns enzimek közül a glutathion-reduktáz aktivitása a HMV 847-es késői érésű törzsben UV-B hatására megnőtt. A többi genotípusban nem volt szignifikáns változás. Az aszkorbát peroxidáz enzim aktivitása a HMV 5405-ös késői érésű törzsben kismértékben lecsökkent, a kataláz viszont egyikben sem változott. A legdrasztikusabb változás a glutathion-S-transzferáz aktivitásában mutatkozott: ennek aktivitása a 2 késői, valamint a 89-79-es korai törzsben jelentősen lecsökkent, viszont a LDR 08-as törzsben nem változott. Meg kell jegyezni, hogy ennek a vonalnak a glutathion-S-transzferáz aktivitása már a kontroll növények esetében is rendkívül alacsony volt. A gvajakol peroxidáz aktivitása mind a 4 törzs esetében csökkent, de a szórás miatt az LDR-08-as törzsnél ez a változás nem volt szignifikáns.

Az antioxidáns enzimek aktivitásával kapcsolatos eredmények is azt a megfigyelést támasztják alá, hogy a korai, azaz az UV-B sugárzásra érzékeny törzsek reaktív oxigénformákat elimináló képessége sokkal gyengébb, mint a későieké.



5. ábra. Az UV-B hatása egyes antioxidáns enzimek aktivitására beltenyésztett kukoricavonalak leveleiben.